



ORSZÁGOS  
TALÁL MÁNYI  
HIVATAL

# SZABADALMI LEÍRÁS

158035

Nemzetközi osztályozás:  
A 61 k 23/00

Bejelentés napja: 1968. V. 28.

(TU—141)

Közzététel napja: 1970. VI. 06.

Megjelent: 1971. III. 01.



Dr. Tuboly Sándor állatorvos,  
Dr. Szent-Iványi Tamás állatorvos,  
Budapest

## Eljárás fajspecifikus gümőkór diagnosztikum előállítására

1

A találmány fajspecifikus gümőkór diagnosztikumok, különösen a szarvasmarhák gümőkóros fertőzöttségének specifikus kimutatására alkalmas diagnosztikai készítmény előállítására vonatkozik.

Az ember és a különféle állatfajok gümőkóros (tuberkulózis) megbetegedésének felismerésére világszerte a tuberkulinos bőrpróba különféle változatait alkalmazzák. Közegészségügyi és állattenyésztési szempontból különös fontossággal bír a szarvasmarhák gümőkóros fertőzöttségének idejekorán és egyértelmű bizonyossággal való felismerése, mert ez lehetővé teszi a szarvasmarha-állományoknak a gümőkórtól való mentesítését a fellépő fertőzések rendszeres felismerése és a fertőzött állatok elkülönítése útján.

Szarvasmarhákon a *Mycobacterium bovis* okozza a gümőkórt, a mentesítési akció ezért e kórokozó ellen irányul. A jelenleg világszerte használt tuberkulin azonban pozitív reakciót ad nem csak a *M. bovis*-sal, de egyéb, a szarvasmarhára nem kórokozó, de a természetben széleskörben elterjedt mycobacteriumfélésekkel fertőzött állatokban is. Ilyen ún. parallergiás reakciójuk miatt sok olyan szarvasmarha is kiselejtezésre kerül, amelyek nem fertőzöttek a *M. bovis*-szal. Az ilyen nem-specifikus reakciók az emberi gümőkór körjelzésében is zavarólag hatnak.

2

A szarvasmarha-állományok gümőkórtól való mentesítése több országban már évtizedekkel ez előtt megkezdődött és sok országban már felszámolták a *M. bovis* okozta szarvasmarhagümőkórt. Régóta felismerték a parallergiás reakciók zavaró hatását és törekedtek specifikusabb hatású tuberkulin-készítmény előállítására. Mint-hogy az eddigi kutatások következetesen a mycobacteriumok fehérje (protein) természetű anyagaiban keresték a specifikus hatású allergéneket, a parallergiás reakciók kiküszöbölésére megkísérelték a tuberkulin-fehérjék kémiai tisztítását és ún. PPD (purified protein derivative) tuberkulinokat állítottak elő. Kísérletek folytak a tuberkulo-proteinek frakcionálására is, de az így nyert készítmények sem tették lehetővé a gümőkórral és más mycobacteriumokkal fertőzött egyedek elkülönítését. Az ún. szimultán tuberkulinpróba, amikor emlős- és madártuberkulinnal párhuzamosan végzik a próbát a parallergiás reakciók elkülönítésére szintén csak részben vált be.

Találmányunk azon az új felismerésünkön alapul, hogy a különféle *Mycobacterium*-fajok okozta fertőzöttség specifikus kimutatására nem a mycobacteriumok fehérje-frakciója, hanem az e baktériumok fehérjéinek egyikéhez kötött poliszaccharid-frakció alkalmas. A mycobacteriumok mindegyike több lipoid-, fehérje- és poli-

szaccharid-természetű anyagot tartalmaz. Ezek közül egyes közös poliszaccharid-frakcióinak tulajdoníthatók azok az ún. parallergiás reakciók, amelyek folytán nem csak a homológ, de más Mycobacterium-fajokkal fertőzött állatok is pozitív reakciót adnak, pl. a *M. bovis*-ből készült tuberkulin befecskendezésére, amely mindezeket az anyagokat tartalmazza.

Ha viszont a különféle Mycobacterium-fajok tenyészetéből ill. azok kivonatából a jelenlevő többféle fehérje-poliszaccharid komplexet elkülönítjük egymástól és az így nyert frakciókban a fehérjét elválasztjuk és eltávolítjuk a poliszaccharid mellől, akkor — amint ez irányú kutatómunkánk során felismertük — találunk egy olyan lényegileg egységes poliszaccharid frakciót, amely specifikusan csak a homológ Mycobacterium-fajjal fertőzött egyedeken ad pozitív reakciót.

Az egyes Mycobacterium-tenyészetekből kinyert fehérjepoliszaccharid komplexek frakcionálás útján történő szétválasztására azért van szükség, mert az egyes fajok tiszta tenyészetéből kinyerhető antigén anyag sem egységes, hanem többféle fehérjét tartalmaz és ezek mindegyikéhez másfajta poliszaccharid kapcsolódhat, e poliszaccharidok közül általában azonban csak az egyik ad biztosan fajspecifikus reakciót. Az, hogy melyik jelenlevő fehérjéhez van a keresett fajspecifikus poliszaccharid kötve, ugyancsak jellemző az egyes Mycobacterium-fajokra, tehát ennek egyszerű megállapítása után már minden esetben ugyanazt a jellemző tulajdonságokat mutató és e jellemző tulajdonságok alapján elkülöníthető frakciót kell csupán kinyerni a kívánt fajspecifikus antigén előállítására céljából.

E felismerésünk merőben új, minthogy eddig még az sem volt ismeretes, hogy a mycobacteriumok fehérjementes poliszaccharid-antigénjei egyáltalán alkalmasak diagnosztikai reakciók lefolytatására, még kevésbé lehetett tehát ismeretes az, hogy az allergén anyag frakcionálása és valamely frakcióból nyert fehérje-poliszaccharid komplex fehérje-részének eltávolítása útján olyan poliszaccharid-készítményhez juthatunk, amely specifikusan alkalmas a különféle Mycobacterium-fajokkal való fertőzöttség egyértelmű felismerésére.

A fajspecifikus tuberkulo-poliszaccharid elkülönítésén alapuló találmányunk értelmében tehát a különféle Mycobacterium-fajokkal való fertőzöttség megállapítására alkalmas fajspecifikus diagnosztikai készítmény előállítása oly módon történik, hogy a megfelelő Mycobacterium-törzs tenyészetéből a szokásos módon készített kivonatból zsírolószerszettel eltávolítjuk a zavaró lipoidokat, majd megfelelő frakcionálási eljárással szétválasztjuk a jelenlevő különböző fehérje-poliszaccharid komplexeket és ezek közül abból, amelynek poliszaccharid-része a kívánt fajspecifikus reakciót adja, a fehérje-poli-

szaccharid kötés megbonthatása után a poliszaccharid-részt elkülönítjük.

Az egyes Mycobacterium-tenyészetekben jelenlevő különböző fehérje-poliszaccharid komplexek szétválasztása célszerűen a fehérjék izoelektromos pontjának különbözősége alapján, elektroforézissel vagy az egyes frakcióknak az izoelektromos pontján történő frakcionált kicsapásával folytatható le. Az egyes Mycobacterium-fajok tiszta tenyészetében minden esetben ugyanazokat a jellemző fehérje-poliszaccharid frakciókat tartalmazza és így minden Mycobacterium-faj esetében egyszer s mindenkorra megállapítható, hogy mi az elektroforézissel szétválasztható frakciók izoelektromos pontja és melyik az a frakció, amely a kívánt fajspecifikus tuberkulo-poliszaccharidot tartalmazza.

Igy a Mycobacterium bovis tenyészetekből nyert kivonat fehérjefrakcióit a következő értékek jellemzik:

a frakció jele	izoelektromos pontja
A	6,8
B	9,6
C	3,8
D	9,3

A Mycobacterium avium tenyészetek fehérjefrakcióinak izoelektromos pontja:

a	6,6
b	9,0
c	4,2

Vizsgálataink szerint e frakciók közül a *M. bovis* esetében a „B” frakció, a *M. avium* esetében pedig a „b” frakció tartalmazza a fajspecifikus tuberkulin- (és szerológiai) reakciót adó poliszaccharidot és így ezt a frakciót kell a fajspecifikus diagnosztikai készítmény előállítására céljából elektroforézissel vagy az izoelektromos pontokon történő frakcionált kicsapással elkülöníteni és abból a fehérje-rész eltávolítása után a tiszta poliszaccharid-részt kinyerni.

Hasonló módon, a tenyészet lipoidoktól mentesített kivonatának elektroforézissel való frakcionálása és az egyes frakciókból elkülönített poliszaccharid-rész vizsgálata után bármely más Mycobacterium-faj esetében is meghatározható a fajspecifikus reakciót adó poliszaccharid, amelyet azután a fent megadott módon különíthetünk el a fajspecifikus diagnosztikai reagens előállítására céljából.

A találmány szerinti eljárással, a fent leírt módon a különféle Mycobacterium-fajok, pl. *M. bovis* vagy *M. avium* tenyészetéből nyert poliszaccharid-frakciók immunkémiaiilag egységesek és sem szerológiai, sem allergiás próbákban nem adnak keresztreakciót. A kívánt frakció elkülönítése és a fehérje-rész eltávolítása után vizes oldatban kapott poliszaccharid elkülönítése önmagában ismert módszerekkel, pl. az oldat gélfiltrálás oldat pH-értékét 7,2-re állítjuk.

vagy ioncsere útján való sómentesítése és bepárlás, vagy pedig a poliszaccharid kicsapására alkalmas vízzel elegyedő szerves oldószer, pl. etanol hozzáadásával való kicsapás útján történhet. Ez utóbbi módszer általában előnyösebb, mert az így száraz por alakjában kapott poliszaccharid jól eltárolható, könnyen standardizálható és pontosan mérhető, ami a szerológiai vagy allergiás diagnosztikai készítmények előállítását megkönnyíti. A szerológiai készítményeknek vagy diagnosztikai reagenseknek az így elkülönített és kipreparált poliszaccharid-frakcióból való előállítása a szokásos módon, a szakmában jól ismert módszerekkel történhet.

A találmány szerinti eljárás gyakorlati kiviteli módjait közelebbről az alábbi példák szemléltetik.

#### 1. példa

*Mycobacterium bovis* szintetikus táptalajon a szokásos módon szaporított 6 hetes tenyészetét autoklávban 112 C°-on előljük, majd Buchner-tölcséren szűrjük és a szűrletet vízfürdön eredeti térfogatának mintegy  $\frac{1}{10}$ -ére betöményítjük. Ezután a betöményített szűrletet a jelenlevő lipoidok eltávolítása céljából petroléterrel vagy más zsírolddósszerrel kirázzuk.

Az így kapott, lipoidoktól mentes vizes oldatot elektroforézises szétválasztásnak vetjük alá. A közép feszültségű papírelektroforézist Schleicher-Schüll vagy Whatman szűrőpapíron. 1300—1500 V feszültség és 40 mA áramerősség alkalmazásával, 4,2 pH-értékű ecetsavas piridin pufferral folytatjuk le. Az egyes frakciók izoelektromos pontját és elektroforézises mobilitását az alábbi táblázat mutatja:

Frakció	izoelektromos pont	mobilitás-érték
A	6,8	—0,30
B	9,6	—0,20
C	3,3	—0,75
D	9,3	—0,10

A fajspecifikus tuberkulo-poliszaccharidot tartalmazó „B” frakciót a papírról 7,2 pH-értékű foszfát-pufferral eluáljuk, az oldatot  $\frac{1}{10}$  térfogatra bepároljuk, majd pH-értékét az izoelektromos pontnak megfelelő 9,6-ra állítjuk be nátriumhidroxidoldat segítségével. Az oldatot ezután +4 C° hőmérsékleten 6 óra hosszat állni hagyjuk. E pH-értéken végbemegy a fehérje-poliszaccharid kötés hidrolízise és a fehérje csapadék alakjában kiválik az oldatból. A csapadékot azután centrifugálással eltávolítjuk és a fajspecifikus poliszaccharid hatóanyagot tartalmazó oldat pH-értékét 7,2-re állítjuk.

Az oldatból a poliszaccharidot ötszörös térfogatú absz. alkohol hozzáadásával kicsapjuk vagy az oldatot Sephadex G 25 gél tartalmazó oszlopon sómentesítjük. Az oszlopról 7,2 pH-értéken

eluált tiszta poliszaccharid-frakciót bepárlással koncentrálnak.

A kapott tiszta poliszaccharid a *M. bovis* fertőzés fajspecifikus diagnosztikuma, amely más *Mycobacterium*-fajjal fertőzött állaton nem ad pozitív tuberkulin- (ill. szerológiai) reakciót. A tiszta poliszaccharid legkisebb hatásos adagját fertőzött tengerimalacok vagy nyulak bőrén a szokásos módon titráljuk és ennek alapján készíttjük el önmagában ismert módon a diagnosztikai reagenst.

#### 2. példa

Az 1. példában leírtához hasonló módon járunk el, de kiindulóanyagként a *Mycobacterium avium* szintetikus táptalajon szaporított 4 hetes tenyészetét alkalmazzuk. A leírt módon lefolytatott papírelektroforézis során az alábbi frakciókat kapjuk:

Frakció	izoelektromos pont	mobilitás-érték
a	6,6	0,00
b	9,0	—0,28
c	4,2	—0,84

A fajspecifikus tuberkulo-poliszaccharidot tartalmazó „b” frakciót a papírról 7,2 pH-értékű foszfát-pufferral eluáljuk, az oldatot  $\frac{1}{10}$  térfogatra bepároljuk, majd pH-értékét a frakció izoelektromos pontjának megfelelő 9,0-ra állítjuk be. A továbbiakban az 1. példában leírt módon eljárva, a *Mycobacterium avium* általi fertőzés kimutatására alkalmas fajspecifikus diagnosztikai reagenst kapunk.

#### 3. példa

A *Mycobacterium bovis* vagy *M. avium* 4 hetes Sautontenyészetét hővel, autoklávban előljük, majd a baktérium-testeket centrifugálással elkülönítjük és az így kapott baktérium-üledékből a lipoidokat zsírolddósszerrel kivonjuk. A baktérium-üledékből a lipoidokat zsírolddósszerrel kivonjuk. A baktérium-üledékhez e célból éter és etanol 1:3 arányú elegyét adjuk, vízfürdön az oldószerkelet forráspontjáig melegítjük, majd az oldószeret dekantáljuk és friss oldószerkelettel helyettesítjük. Többszöri felrázás mellett szobahőmérsékleten 48 óra hosszat állni hagyjuk, eközben az oldószerkeletet még egyszer cseréljük. Ezután az oldószerkeletet ismét dekantáljuk, a baktérium-üledékhez 10 rész izopropilalkoholt adunk és 2 napig 37 C° hőmérsékleten állni hagyjuk. Az oldószer eltávolítása után a baktériumtömeghez mintegy tízszeres mennyiségű n/20 sósavoldatot adunk és 100 C° hőmérsékleten 50—60 percig hidrolizáljuk az anyagot. Ezután a nem oldódott részt centrifugálással elkülönítjük és az oldatból az egyes fehérje-frakciókat az 1. ill. 2. példában megadott izoelektromos pontoknak megfelelő pH-értékek növekvő sorrendben való beállításával egymás után kicsapjuk és elkülönítjük.

Mycobacterium bovis esetében a „B” frakciót, M. avium esetében pedig a „b” frakciót az 1. példában leírt módon dolgozzuk fel tovább.

*Szabadalmi igénypontok:*

1. Eljárás fajspecifikus hatású gümőkór diagnosztikum előállítására Mycobacterium törzsek, előnyösen Mycobacterium bovis vagy M. avium előlt tenyészetének a lipoidoktól zsirolószerrel mentesített kivonatából vagy centrifugált üledékéből, azzal jellemezve, hogy a tenyészet betöményített szűrletéből vagy a baktérium-üledék savas hidrolízissel nyert kivonatából az egyes fehérje-poliszaccharid komplexeket elektroforézissel vagy az egyes frakciók izoelektromos pontjának megfelelő pH-értékre való beállításával szétválasztjuk és a kívánt fajspecifikus tuberkulin- (ill. szerológiai) reakciót adó poliszaccharid-részt tartalmazó frakcióból a fehérjét a fehérje-poliszaccharid kötés elbontásával eltávolítjuk, majd a tiszta fajspecifikus poliszaccharidot kicsapással vagy gél-filtrálással el-

különítjük és diagnosztikai reagenssé dolgozzuk fel.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás kiviteli módja, azzal jellemezve, hogy Mycobacterium bovis tenyészeit alkalmazzuk kiindulóanyagként és a 9,6 izoelektromos pontú frakciót különítjük el.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás kiviteli módja, azzal jellemezve, hogy Mycobacterium avium tenyészetét alkalmazzuk kiindulóanyagként és a 9,0 izoelektromos pontú frakciót különítjük el.

4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás kiviteli módja, azzal jellemezve, hogy a fehérje eltávolítása után a poliszaccharidot a bepárolt oldat alkohollal való elegyítése útján csapjuk ki.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás kiviteli módja, azzal jellemezve, hogy az előállított tuberkulo-poliszaccharidot allergiás (tuberkulin) vagy szerológiai diagnosztikai készítménnyé dolgozzuk fel.